



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

LARYSSA DE OLIVEIRA CARVALHO

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO GTS  
DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SÃO CRISTOVÃO

2016

LARYSSA DE OLIVEIRA CARVALHO

## **ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO GTS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de curso,  
apresentado como requisito parcial à  
obtenção do grau de Bacharelado em  
Farmácia, pela Universidade Federal de  
Sergipe.

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Di Pietro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulce Marta  
Schimieguel Mascarenhas Lima

SÃO CRISTOVÃO

2016

## RESUMO

Mundialmente, o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres. A cada ano, 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama, apresentando altas taxas de mortalidade, sendo no Sul do Brasil segundo maior incidente. A glutathione S-transferase (*GST*) é uma família de enzimas intracelulares que catalisam a conjugação de compostos eletrolíticos diversos, promovendo a formação de substâncias menos reativas e mais solúveis em água. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são polimórficos em humanos, e estão presentes ou ausentes de forma homozigótica em diferentes populações étnicas. Indivíduos com a deleção homozigótica destes genes podem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças atribuídas à exposição de carcinógenos. O objetivo deste estudo foi verificar se a ocorrência de deleções homozigóticas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o polimorfismo heterozigótico do gene *GSTP1* estão associadas com o aumento da susceptibilidade ao câncer de mama. Em estudo tipo caso-controle composto por 23 mulheres portadoras de câncer e 3 mulheres sem câncer. Para os testes moleculares foi utilizado multiplex da reação em cadeia de polimerase (PCR) para *GSTM1* e *GSTT1*, e PCR quantitativo para o polimorfismo *GSTP1*. As frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* nulos foram 53,8% e 38,5%, respectivamente. Para o polimorfismo *GSTP1*, as frequências genotípicas foram: 47,8% para o genótipo Ile/Ile, 47,8% para o genótipo Ile/Val e 15,4% para o genótipo Val/ Val. Houve uma associação entre a combinação dos genótipos (T-/M-) nulos e o genótipo *GSTP1* Ile/Val que sugerem uma maior susceptibilidade ao câncer de mama, porém mais estudos precisam confirmar esses achados.

**Palavras-Chave:** câncer de mama, polimorfismos genéticos, GST.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Dados antropométricos dos pacientes.....	20
<b>Tabela 2</b> - Dados clínicos dos pacientes.....	21
<b>Tabela 3</b> - Teste t-Student para amostras independentes.....	22
<b>Tabela 4</b> - Frequência dos genes GSTM1 e GSTT1 na população estudada .....	25
<b>Tabela 5</b> - Frequência dos genes GSTP1 na população estudada.....	27
<b>Tabela 6</b> - Porcentagem dos genes GSTT, GSTM e GSTP nas pacientes controle/estudo.....	28

---

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
2.1 - Objetivo Geral.....	8
2.2 - Objetivos Específicos .....	8
<b>3- REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
<b>4- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
4.1 - Casuística .....	15
4.2 – Dados antropométricos e clínicos .....	16
4.3 – Extração do DNA .....	16
4.4 - Amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase: Detecção dos polimorfismos do gene <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> através de multiplex PCR.....	16
4.5 - Análise do polimorfismo do gene <i>GSTP1</i> por PCR-RFLP.....	17
4.6 – Análises estatísticas .....	17
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>

## 1- INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico utilizado para um grupo de mais de 100 doenças que podem afetar várias partes do corpo e caracteriza-se pela proliferação celular anormal (INCA, 2016). Estas células tendem a ser muito agressivas determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Os diferentes tipos de câncer são nomeados conforme a parte do corpo onde o tumor originou-se. Essa proliferação incontrolada de células anormais pode afetar tecidos contíguos e se espalhar para outros órgãos do corpo levando ao chamado processo metastático. A metástase é a maior causa de morte por câncer (WHO, 2012). O câncer pode ter início em tecidos epiteliais, sendo designado carcinoma, ou em tecidos conjuntivos, sendo designado sarcoma e, em ambos os casos, pode haver metástase (INCA, 2008).

Mundialmente, o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres. No Brasil, é o segundo tipo de câncer mais incidente no sexo feminino nas regiões Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Na região Norte do país é o terceiro mais incidente, sendo superado apenas pelo câncer de pele não melanoma e o câncer de colo de útero. As estimativas para o ano de 2015 foram de 56,1 casos novos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2014).

Atualmente, em países desenvolvidos, a sobrevida de mulheres que tiveram a doença é de 85% após cinco anos e, em países em desenvolvimento, a sobrevida está entre 50% e 60% (BRASIL, 2014). Em 2012, a estimativa mundial de recidiva após cinco anos era de 6,2 milhões (36,4%) e no Brasil era de 245 mil (42,4%).

Apesar de o tratamento adjuvante ser fundamental para o controle do crescimento celular tumoral, ele pode, além de eliminar as células tumorais, danificar as células saudáveis e assim, exceder a capacidade antioxidante do organismo e agravar o estado de estresse oxidativo (EO) (ROSSI *et al.*, 2009). Esse estado de EO, o qual é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e a neutralização destas substâncias pelos compostos antioxidantes (HALLIWEL, 2011), que tem sido associado tanto ao desenvolvimento do tumor primário quanto a recidiva da doença (GORRINI, *et al.* 2013; ROSSI *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, tem havido grandes avanços no conhecimento dos polimorfismos genéticos que afetam tanto as enzimas envolvidas na ativação e desintoxicação de certos agentes quimioterápicos, bem como alvos moleculares envolvidos no tratamento do câncer. A correta identificação de pacientes com as formas hereditárias de câncer de mama e uma abordagem molecular para a detecção de mutações associadas ainda são um desafio no contexto genético em todo o mundo. Assim, existe um interesse constante para estudar polimorfismos de genes que podem estar associados com a doença. (GONZÁLEZ, *et al.* 2008)

Algumas pesquisas têm sido realizadas no Brasil em busca de genes marcadores de susceptibilidade para o câncer de mama. Uma associação estatisticamente significativa entre o GSTM1 e GSTT1 combinados ou isoladamente, genótipos nulos (M/T) e alterações na densidade da mamografia em mulheres pós-menopausa ( $p=0,031$ ) foi encontrado por Aguiar et al, 2012. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer a importância das mutações GST entre mulheres brasileiras com câncer de mama e a prevalência de mutações específicas.

O presente estudo analisou os genes codificadores das enzimas GST, caracterizando os polimorfismos encontrados na população de estudo. Adicionalmente, foram determinadas também as frequências alélicas dos referidos genes nessa população, o que permitiu a identificação, no grupo de pacientes amostrados, de possíveis polimorfismos associados ao aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo Geral**

O presente projeto tem como objetivo analisar os genes codificadores das enzimas GSTT1, GSTM1 e GSTP, caracterizando os polimorfismos encontrados na população de estudo, quanto a sua frequência e correlacionando com o desenvolvimento com o Câncer de Mama.

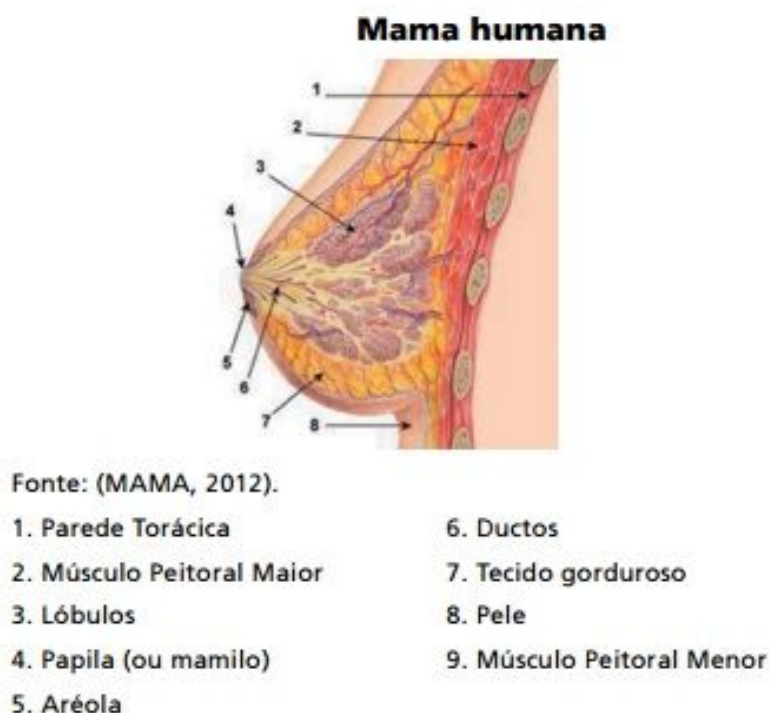
### **2.2 - Objetivos Específicos**

- Avaliar os tipos e frequências de mutações encontradas para cada gene em análise;
- Avaliar a frequência dos polimorfismos encontrados com a população estudada;
- Correlacionar os resultados genômicos encontrados com as características antropométricas, relacionadas a doença e a outras variáveis encontradas na população estudada.



### 3- REVISÃO DA LITERATURA

A mama feminina é constituída por um corpo glandular que repousa sobre a parede do tórax. Envoltó pelo fâscia e recoberto por pele, se estende até a região da axila formando o prolongamento axilar. A pele se diferencia em sua porção central, formando a aréola de onde emerge a papila, constituindo o complexo areolopapilar. O corpo glandular é formado por dois sistemas: o sistema ductal, formado por ductos que iniciam na papila e possuem várias ramificações, e o sistema lobular, composto por lóbulos, localizados nas extremidades das ramificações ductais. Os lóbulos são responsáveis pela formação de leite que é transportado por meio dos ductos até sua exteriorização na papila. Os sistemas ductal e lobular são sustentados por tecido conjuntivo e gordura, por onde passam nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Os vasos linfáticos da mama drenam a linfa principalmente para os linfonodos das cadeias axilar e mamária interna (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).



**Figura 1:** Aspectos anômicos da Mama.

Fonte: [http://www.infantgrapevine.co.uk/pdf/inf\\_014\\_lbt.pdf](http://www.infantgrapevine.co.uk/pdf/inf_014_lbt.pdf)

O assoalho muscular é composto principalmente pelos músculos peitoral maior, peitoral menor e serrátil anterior, que se relacionam com a face profunda da mama separando-a do gradil costal. Geralmente, as mamas não são do mesmo tamanho, havendo uma discreta assimetria entre elas. A forma da mama pode variar em função da idade, lactação, gestação, obesidade e período menstrual. Topograficamente, as mamas são divididas em quadrantes superiores (lateral e medial), inferiores (lateral e medial) e região central. A divisão em quadrantes é importante para a localização e correlação dos achados de exame clínico e de imagem (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O câncer de mama inicia-se no tecido mamário que é composto por lóbulos (glândulas de leite) e ductos, que conectam os lóbulos ao mamilo; o restante da mama é formado por tecido adiposo, conectivo e linfático. (ACS, 2007). Os carcinomas mamários mais frequentes são classificados em carcinoma in situ - carcinoma ductal in situ (DCIS) e carcinoma lobular in situ (LCIS) se caracterizam por estarem confinados à área onde se originaram (ductos ou lóbulos), ou seja, não há invasão de tecidos vizinhos. Quase todos os cânceres nesse estágio podem ser curados (ACS, 2007). Ou carcinoma invasivo ou infiltrante - também se inicia nos lóbulos e ductos, porém ultrapassa a barreira do tecido onde se originou e invade o tecido mamário vizinho (ACS, 2007).

Para a maioria dos diferentes tipos de câncer, a classificação de tumores é baseada em três fatores principais (classificação TNM – Tumor, Nódulo e Metástase): tamanho do tumor (T), envolvimento de nódulos linfáticos (N) e presença ou ausência de metástase (M); uma vez T, N e M determinados, o tumor é então classificado em estádios - I, II, III ou IV - sendo I o mais inicial e IV o mais avançado (INCA, 2004b)

A etiologia do câncer de mama pode se dar por diversos fatores, incluindo fatores genéticos (BAN, *et al* 2014), comportamento reprodutivo (BAN, *et al.* 2014; BRASIL, 2014), sedentarismo (BAN, *et al* 2014; BRASIL, 2014; CATSBURG *et al.*, 2014; WCRF/AICR, 2007), excesso de peso corporal (BAN, *et al* 2014; BRASIL, 2014; CATSBURG *et al.* 2014; WCRF/AICR, 2007), consumo de álcool (BAN, *et al.* 2014; BRASIL, 2014; WCRF/AICR, 2007), envelhecimento (BAN, *et al.* 2014; BRASIL, 2014) e alimentação inadequada (BAN, *et al.* 2014; BRASIL, 2014; WCRF/AICR, 2007). A prática regular de atividade física diminui o risco de câncer de cólon e reto, de mama (na pós-menopausa) e de endométrio; além disso, reduz o risco de desenvolver

obesidade (fator de risco para diversos tipos de câncer). (INCA, 2012). A obesidade é um fator de risco importante para os cânceres de endométrio, rim, vesícula biliar e mama. Mulheres mais velhas, sobretudo a partir dos 50 anos de idade, têm maior risco de desenvolver câncer de mama. O acúmulo de exposições ao longo da vida e as próprias alterações biológicas com o envelhecimento aumentam, de modo geral, esse risco. (INCA, 2015).

No ano de 2012 a perspectiva mundial de mortalidade por câncer de mama era de aproximadamente 522 mil óbitos, representando 14,7% do total de cânceres, e no Brasil era de aproximadamente 16 mil casos, representando 15,8% do total de cânceres (GLOBOCAN, 2012). É a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do câncer de pulmão, e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2014). No Brasil, segundo informações do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde (MS), no ano de 2011, a cada 100 mil óbitos 13.225 foram decorrentes do câncer de mama (13,2%) (BRASIL, 2014).

A fração dos casos de câncer de mama atribuíveis ao estilo de vida e fatores ambientais no Reino Unido foi estimada em 26,8% em 2010 (PARKIN DM, *et al.* 2010). Uma revisão recente sugere que metade dos casos de câncer de mama podem ser evitados, se a quimioprevenção é aplicada em situação apropriada de risco das populações, sendo os principais fatores de risco modificáveis, incluem atingir e manter um peso saudável, atividade física regular, e ingestão mínima de álcool (COLDITZ, *et al.* 2014). Assim, existem outras possibilidades de reduções importantes na incidência a de câncer de mama. No entanto, existem grandes lacunas no nosso conhecimento para determinar o risco de câncer de mama com precisão, a fim de aplicar essas abordagens para populações apropriadas de mulheres. (HOWELL, *et al.* 2014).

A Sociedade Americana de Oncologia Clínica publicou sua diretriz de prática clínica em Agosto de 2013 (VISVANATHAN, *et al.* 2013). O relatório incluiu uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e metanálises publicados entre 2007 e 2013, que identificou 19 ensaios e seis agentes de quimioprevenção. Em mulheres que estão em maior risco de câncer de mama e que tem mais de 35 anos de idade, eles sugerem que o tamoxifeno (20 mg por dia, durante 5 anos) seja discutido como uma opção para reduzir o risco de cancer da mama. Em mulheres pós-

menopáusicas, o raloxifeno (60 mg por dia, durante 5 anos) e exemestane (25 mg por dia, durante 5 anos) também devem ser discutidos como opções para redução do risco de câncer de mama (VISVANATHAN, *et al.* 2013).

A identificação de genes marcadores de susceptibilidade a doenças tem sido realizada, em geral, por meio de estudos caso-controle, comparando-se as frequências de um determinado gene polimórfico entre as populações doente e sadia (REIS, 2010). Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (loci) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004). As diferenças genéticas baseadas em polimorfismos, com potencial em afetar a aptidão e a performance física humana, começaram a ser investigadas nos anos de 1990. Uma alteração na sequência de bases do DNA de um gene que codifica uma proteína pode influenciar tanto sua expressão quanto sua atividade. (RANKINEN *et al.*, 2000).

A glutathione S-transferase é uma família de enzimas intracelulares localizadas no citosol da célula que previne a ação de certas substâncias nas células, evitando dano ao DNA. Essas enzimas catalisam a conjugação de compostos eletrolíticos diversos, sendo que a glutathione, na maior parte, promove a formação de substâncias menos reativas e mais solúveis em água que são prontamente excretadas na urina, prevenindo possíveis mutações que essas substâncias podem vir a causar. (ZHENG, *et al.* 2003). A família destas enzimas é composta por proteínas diméricas multifuncionais, que conjugam glutathione reduzida a substratos eletrofilicos, o que, de uma forma geral, torna os produtos glutathione-conjugados menos reativos e mais hidrossolúveis, facilitando sua excreção, e são consideradas como um dos principais sistemas de enzimas destoxicantes envolvidas nas reações de biotransformação de fase II (reações de conjugação) (MANNERVIK *et al.*, 1994; PEMBLE *et al.*, 1994).

Os genes *GSTM1* e *GSTT1*, que pertencem à família das GSTs, codificam as principais proteínas envolvidas na conjugação de substratos que são tóxicos para as células. Ambos os genes são altamente polimórficos e podem estar presentes ou suprimida em forma homozigótica. (TORRESAN, *et al.* 2008).

O gene *GSTT1* (AB057594) está localizado no cromossoma 22q11.23, tem 8146 pares de bases e é constituída por cinco exões e quatro intrões, que codificam uma proteína com 240 aminoácidos. Este gene tem diferenças importantes em sua atividade catalítica, quando comparado com outros membros da família GST e é considerado um dos mais antigos membros da família GST. (TORRESAN, *et al.* 2008).

O gene que codifica a *GSTM1* é constituído por 7 exões no cromossoma 1p13.3 e tem como variantes os alelos: *GSTM1*\*A, *GSTM1*\*B, *GSTM1*\*C e nulo. (PAVANELLO, *et al.* 2000; GEMIGNAMI, *et al.* 2007)

O gene *GSTP1* localiza-se em 11q13 e é polimórfico, condicionando importantes diferenças na atividade da enzima de acordo com o genótipo apresentado. Foram identificados dois locais polimórficos: no exão 5 *GSTP1*Ile105Val (313 A>G; rs947894) e no exão 6 *GSTP1*Ala114Val (341 C>T; rs1799811) (ZIMINIYAK, *et al.* 1994, GEMIGNAMI, *et al.* 2007). O gene *GSTP1* tem importância não somente na detoxificação de carcinógenos presentes em produtos industrializados, carnes grelhadas a altas temperaturas, como na detoxificação de carcinógenos inaláveis (HONMA, *et al.* 2008).

Recentemente foi realizada a avaliação dos polimorfismos do gene codificador das principais enzimas do grupo das *GST*, caracterizando a frequência dos alelos da *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* encontrados em um subgrupo da população de Ilhéus, na Bahia, (MAGNO, *et al.* 2009) selecionando-se famílias com mais de duas gerações residentes no município. Da mesma forma, uma revisão bastante detalhada do assunto, demonstrando a associação destes polimorfismos com a susceptibilidade a diversos tipos de câncer foi publicada, enfatizando a necessidade de maiores estudos com este tipo de associação, principalmente em populações altamente miscigenadas como a Brasileira (DI PIETRO, *et al.* 2010). Outros trabalhos veem sendo desenvolvidos em populações do nordeste brasileiro avaliando associações entre polimorfismos das *GSTs* com câncer das vias aéreas superiores (SILVA *et al.*, 2014) ou ainda com o desenvolvimento do glaucoma (ROCHA *et al.*, 2011).

Mais investigações com outros marcadores de susceptibilidade genética ao câncer de mama devem ser pesquisados como alterações no gene 1) *BRCA1* e *BRCA2*. A existência de uma predisposição dominante que confere alto risco de desenvolvimento de câncer de mama pode ser confirmado com a análise de mutações

dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As mutações funcionais desses dois genes estão fortemente associadas a um aumento dramático do risco de câncer de mama, no entanto, essas mutações são raras, ocorrendo com maior frequência em apenas alguns grupos de alto risco (ONAY *et al.*, 2006; MARCHAND *et al.* 2005). Atualmente, polimorfismos nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são os principais marcadores estudados no câncer de mama, sendo encontrados com maior frequência em mulheres com a doença (SEONG, *et al* 2014), 2) o gene *Aurora A* que atua na regulação da duplicação do centrôssomo (LO *et al.*, 2005); 3) *MTHFR* responsável pela codificação da enzima metilenotetrahydrofolato redutase envolvida no metabolismo do ácido fólico (CAMPBELL *et al.*, 2002; CHOU *et al.*, 2006); 4) *CCND1* que codifica a proteína ciclina D1, importante na regulação do ciclo celular (CESCHI *et al.*, 2005, SHU *et al.*, 2005); 5) *p53*, que codifica a proteína p53, uma proteína supressora de tumor envolvida no controle do ciclo celular e apoptose (FRANEKOVA *et al.*, 2007); 6) o gene *CYP17* que codifica uma enzima envolvida na biosíntese do estrogênio (MITRUNEN ; HIRVONEN, 2003).

Algumas pesquisas têm sido realizadas no Brasil em busca de genes marcadores de susceptibilidade para o câncer de mama. Uma associação estatisticamente significativa entre o GSTM1 e GSTT1 combinados ou isoladamente, genótipos nulos (M/T) e alterações na densidade da mamografia em mulheres pós-menopausa foi encontrado por Aguiar *et al*, 2012. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer a importância das mutações GST entre Mulheres brasileiras com câncer de mama e a prevalência de mutações específicas.

#### 4- METODOLOGIA

Neste trabalho foram analisados os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP* e sua associação com a susceptibilidade ao câncer de mama, em um estudo tipo caso-controle. Participaram do estudo 26 pacientes voluntárias onde 3 representadas em vermelho nas tabelas 09, 119 e 158, não apresentam tumor e 23 dessas pacientes apresentavam. A escolha desses genes, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP*, deveu-se ao seu potencial como marcadores de susceptibilidade para diferentes tipos de câncer, e por serem genes que participam da via metabólica do estrogênio endógeno e exógeno, indicando indivíduos ou populações com diferenças genéticas capazes de modular a susceptibilidade ao câncer de mama (CARDOSO-FILHO, 2007).

##### 4.1-Casuística:

Trata-se de um estudo de cooperação entre o Laboratório de Comportamento Alimentar, Grupo Estudos de Nutrição e Estresse Oxidativo (GENEO) da Universidade Federal de Santa Catarina com o Laboratório de Toxicologia e o Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPaT) da Universidade Federal de Sergipe.

As pacientes com câncer de mama foram selecionadas no estado de Santa Catarina (SC), usuárias do Sistema Único de Saúde (SUS), na Maternidade Carmela Dutra (MCD), localizada no município de Florianópolis/SC, que foram admitidas para realizar cirurgia mamária pela equipe coordenada pelo médico Mastologista Dr. Carlos Gilberto Crippa. A análise dos DNA foi realizada no Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEaT) da Universidade Federal de Sergipe. Todas as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC.

A MCD é uma entidade vinculada ao governo do estado de SC, com atendimentos realizados via SUS. É referência em atendimento ginecológico, obstétrico, neonatal e oncologia ginecológica e é reconhecida pelo Ministério da Saúde (MS) como Centro de Referência Estadual em Saúde da Mulher e Hospital de Ensino do SUS brasileiro.

#### 4.2- Dados Antropométricos e Clínicos

A coleta dos dados antropométricos e clínicos foi realizada pela equipe do Laboratório de Comportamento Alimentar, Grupo Estudos de Nutrição e Estresse Oxidativo (GENEO) da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 4.3- Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada no Laboratório de Comportamento Alimentar através do Kit da Quiagen conforme manual do fabricante, onde foram utilizados 0,5 ml de sangue na presença de 1mL de tampão de Lise 1 (Tris-HCl 0,01M, Sacarose 0,36M, MgCl<sub>2</sub> 5mM, Triton – X 1%). Os tubos foram centrifugados a 6000 g por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensão em 0,3 ml de tampão de Lise 2 (Tris-HCl 0,01M, KCl 50mM, NP40 0,45%, Tween20 0,45%). Posteriormente foi adicionado 5uL de proteinase K (10mg/ml), então incubado a 65°C/1h e a 37°C por mais 3h. O DNA extraído permaneceu congelado sendo posteriormente enviado ao Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEaT) da Universidade Federal de Sergipe onde o DNA foi quantificado e graduado em -20°C para análise molecular por PCR.

#### 4.4- Amplificação de DNA através da Reação em Cadeia da Polimerase: Detecção dos polimorfismos do gene *GSTM1* e *GSTT1* através de multiplex PCR:

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram amplificados em uma reação multiplex PCR utilizando 10ml de 10XPCR Mix (Norgen), 50ng de DNA e 0,5µl de cada primer (10µM), primers: **GSTT1-F** 5'-TCT CCT TAC TGG TCC TCA CAT CTC-3'; **GSTT1-R** 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'; **GSTM1-F** 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'; **GSTM1-R** 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'. Foi utilizado o gene da b-globina como padrão interno, a fim de avaliar se a extração e amplificação do DNA das pacientes procedeu de forma correta, utilizando o seguinte par de primers: **β-GLOBIN-F** 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC e **β-GLOBIN-R** 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'. A mistura foi submetida a 95°C /5min de pré-tratamento seguido por 30 ciclos de 95°C/2min, 60°C/1min, 72°C/1min, e concluído com 72°C/10min para extensão.



Todo este tratamento foi realizado em Termociclador (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research). Cerca de 5 uL dos produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio e as fotos digitalizadas através de sistema digital de armazenamento (Kodak). Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTT1* e *GSTM1* serão identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 480 pares de base (pb) e 215 pb, respectivamente. A presença do fragmento de 550 pb corresponde à sequência amplificada dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e revela o sucesso da reação de amplificação.

#### 4.5- Análise do polimorfismo do gene *GSTP1* por PCR-RFLP:

A reação de amplificação por PCR e o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) foi obtido de acordo com HARRIES *et al*, 1997. Para um volume total de 25 µl por reação, foi utilizado 12,5 µl do PCR Mix, 1 µl de 10 µM cada primer P105F e P105R; e 50 ng de DNA genômico. O ciclo de amplificação foi: 95°C/5min de pré-tratamento, seguidos de 30 ciclos de 94°C/30 segundos, 57°C/30 segundos e 72°C/30 segundos e no final 72°C/5min. Os primers utilizados foram: F: 5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA- 3' e R: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'. Após a reação de amplificação, 20 µl do produto da PCR foi digerido com 5U da enzima *BsmI*, a 55°C/2h, seguindo-se então, com a análise em gel de agarose 3,5% submetido à eletroforese a 80V. Os pares de primers P105F e P105R podem gerar três produtos de amplificação distintos como resultado: um produto constante de 176 pb, referente ao genótipo homozigoto para o alelo selvagem (Ile/Ile), o qual não sofre ação da enzima *BsmI*, originando uma banda não-clivada; um produto com uma banda de 91 pb e outra de 85 pb no caso de o genótipo ser homozigoto para o alelo mutante (Val/Val) que possui um sítio para a enzima de restrição *BsmI*, que cliva o produto inicial; e um produto com três bandas de 176, 91 e 85 pb, caso o genótipo seja heterozigoto (Ile/Val).

#### 4.6- Análise Estatística:

Os dados coletados das 26 pacientes foram organizados em um banco de dados, com dupla entrada com sistema de checagem automática de consistência e amplitude. A medida de associação entre exposição e ocorrência de doença foi o odds ratio (OR). Em seguida foi realizada a descrição dos casos e controles segundo as variáveis de estudo presença dos polimorfismos dos genes *GST*, etnia, gravidade da doença, etc, variáveis contínuas comparadas através do test *t* de Student e variáveis categóricas através do

teste  $\chi^2$ -quadrado. Análise estratificada: (1) associação entre o desfecho (câncer de mama) e presença dos polimorfismos dos genes analisados para toda a população, estimando o OR bruto (não ajustado) e ajustado pelo método de Mantel Haensel; (2) avaliação de interação através de teste de homogeneidade de Mantel Haensel. Análise multivariada com regressão logística condicional: (1) análise de interação através do teste da razão de máxima verossimilhança (*log likelihood ratio test*); comparando modelos com e sem termos de interação; (2) análise de confundimento através da mudança na OR da variável de exposição principal (mudança percentual no OR da associação principal) com eliminação de variáveis utilizando a estratégia backward.

Todas as frequências dos alelos, dos genótipos e dos fenótipos identificadas serão representados como valores percentuais. A equação de Hardy-Weinberg foi utilizada para o cálculo de frequência entre alelos mutantes e selvagens. Valores limites foram utilizados na fenotipagem por pontos de probito e por funções de densidade (kernel). Foi feita análise de agrupamento dos indivíduos com base nos dados de variabilidade genética utilizando-se o método do vizinho mais próximo com base em sinalizadores identificados pelo método Euclidiano. A significância da distribuição genotípica nos grupos foi calculada usando o teste de  $\chi^2$  com 2 graus de liberdade, utilizando o software SPSS, versão 20.0. As diferenças serão consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O risco específico ligado ao genótipo será estimado utilizando o *odds ratios*, com limite de confiança 95%.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Participaram deste estudo, 26 voluntárias, 23 pacientes com câncer de mama e 3 pacientes sem câncer, recrutadas a partir de um grande estudo sobre Comportamento Alimentar, desenvolvido pelo Grupo Estudos de Nutrição e Estresse Oxidativo (GENEO) da Universidade Federal de Santa Catarina pela dificuldade de adesão de pacientes diagnosticados e não diagnosticados com câncer de mama, deu-se preferência a coleta de mulheres diagnosticadas com câncer de mama através da mamografia e biopsia comprobatória, uma vez que a literatura já traz inúmeros achados neste sentido.

As características antropométricas como, idade do diagnóstico, peso, IMC, circunferência da cintura e relação cintura-quadril estão apresentadas na Tabela 1. Os dados mostram que a idade predominante do diagnóstico de câncer foi de 41 a 50 anos de idade ( $n = 10$ ; 38,5%), o que corrobora com os achados da literatura, que indicam que a início da menopausa é um período crítico no desenvolvimento de uma série de doenças, assim como o câncer na população feminina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A história familiar constitui um fator importante, principalmente se o câncer acometeu a mãe ou irmã e se desenvolveu antes da menopausa, aumentando o risco em duas a três vezes. A exposição à radiação ionizante antes dos 35 anos de idade (VAURY et al., 1995), obesidade pós-menopausa, ingestão de dieta gordurosa e consumo elevado de álcool também parecem aumentar o risco (PARKIN, *et al.* 2001).

O que chamou atenção foi o número de mulheres jovens, abaixo de 41 anos, que foram diagnosticadas com câncer de mama ( $n = 6$ ; 23%), sendo que uma das pacientes tinha apenas 33 anos no momento do diagnóstico, demonstrando um forte cunho genético ao desenvolvimento de câncer nestas mulheres, apesar de nem sempre poder ser comprovado com outros familiares que possam ter desenvolvido câncer (Tabela 2).

**Tabela 1:** Dados antropométricos dos pacientes.

<b>Identificação (N)</b>	<b>Idade</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>IMC</b>	<b>Circunferência da cintura (cm)</b>	<b>Relação cintura-quadril</b>
5	41	92	31,60	98	0,83
9	50	89	37,36	100	0,83
26	47	85	30,26	90	0,80
32	51	79	29,84	99	0,93
111	44	54	23,46	70	0,73
117	39	65	29,05	81	0,78
119	38	56	23,71	71	0,74
124	63	56	26,27	80	0,87
134	61	80	27,36	95	0,86
144	36	60	24,34	78	0,85
147	47	68	29,52	98	0,92
152	58	83	33,67	109	0,99
158	61	72	27,55	95	0,94
159	41	89	33,80	104	0,89
161	40	85,2	31,29	87	0,73
163	57	56,3	22,27	84	0,88
167	48	65	26,71	85	0,83
172	33	60	24,19	83	0,83
174	74	102,5	38,82	123	1,03
176	44	73,5	30,99	95,5	0,86
177	57	69,8	28,68	97	0,87
178	39	55	22,03	78	0,83
180	46	60	26,67	85,5	0,89
183	48	94	34,95	105	0,91
186	66	85,8	31,90	111	1,04
191	50	65	28,13	83	0,74

\* Em vermelhos estão representados os controles.

**Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.

**Tabela 2:** Dados clínicos dos pacientes.

Nº	Classificação do câncer	CA família	Uso oral contraceptivo	Menarca	Tamanho do tumor	Estadiamento do tumor
5	ductal infiltrante	Não	Não	16	1,5	Estádio I
9	<b>Doença benigna</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>11</b>	<b>99,0</b>	<b>Não se aplica</b>
26	ductal infiltrante	Sim	Sim	16	2,5	Estádio IIIC
32	ductal infiltrante	Sim	Sim	14	7,0	Estádio IIIB
111	ductal infiltrante	Não	Não	14	2,0	Estádio IIA
117	ductal infiltrante	Não	Não	12	1,5	Estádio I
119	<b>Doença benigna</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>11</b>	<b>99,0</b>	<b>Não se aplica</b>
124	ductal infiltrante	Não	Não	15	1,5	Estádio I
134	ductal infiltrante	Não	Sim	12	-	-
144	ductal infiltrante	Não	Sim	13	7,0	Estádio IIB
147	in situ	Não	Sim	14	14,0	Estádio IIB
152	ductal infiltrante	Não	Não	11	4,0	Estádio IIA
158	<b>Sem AP</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>13</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
159	ductal infiltrante	Não	Sim	14	3,0	Estádio IIIA
161	ductal infiltrante	Sim	Não se aplica	14	-	Estádio I
163	ductal infiltrante	Sim	Não	15	2,0	Estádio I
167	ductal infiltrante	Sim	Sim	15	5,0	Estádio IIA
172	ductal infiltrante	Sim	Sim	13	1,5	Estádio I
174	ductal infiltrante	Não	Não	14	2,5	Estádio IIA
176	ductal infiltrante	Sim	Sim	14	3,5	Estádio IIIA
177	in situ	Sim	Sim	17	2,0	Estádio 0
178	ductal infiltrante	Não	Não	14	1,0	Estádio I
180	ductal infiltrante	Não	Sim	15	2,0	Estádio I
183	ductal infiltrante	Sim	Sim	12	-	-
186	ductal infiltrante	Não	Sim	12	2,0	Estádio I
191	ductal infiltrante	Sim	Sim	14	1,5	Estádio IIIA

\* Em vermelhos estão representados os controles.

**Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.

Outro fator observado foi em relação ao IMC apresentado pela população de estudo, onde 77% (n = 20) estavam acima do peso recomendado, ou seja, IMC acima de 25, sendo que destas, 10 (38,5%) eram obesas. Segunda a literatura, IMC elevado, assim como obesidade é um fator precursor de diversos tipos de câncer, inclusive o de mama. A obesidade e a falta de exercício físico, também são fatores de risco para cancro da mama na pós-menopausa, provavelmente por influenciarem os níveis hormonais, nomeadamente o estrogénio (VOGL, *et al.* 2004).

Foi realizado o Teste t-Student nos índices antropométricos das pacientes, podendo ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Teste t-Student para amostras independentes

	Controle Média ( $\pm$ DP)	Estudo Média ( $\pm$ DP)	<i>p value</i>
Peso (kg)	72,3 ( $\pm$ 16,5)	73,2 ( $\pm$ 14,4)	0,93
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29,54 ( $\pm$ 7,04)	28,95 ( $\pm$ 4,24)	0,83
Circunferência da cintura (cm)	88,7 ( $\pm$ 15,5)	92,1 ( $\pm$ 12,8)	0,67
Relação cintura-quadril	0,84 ( $\pm$ 0,10)	0,86 ( $\pm$ 0,08)	0,59

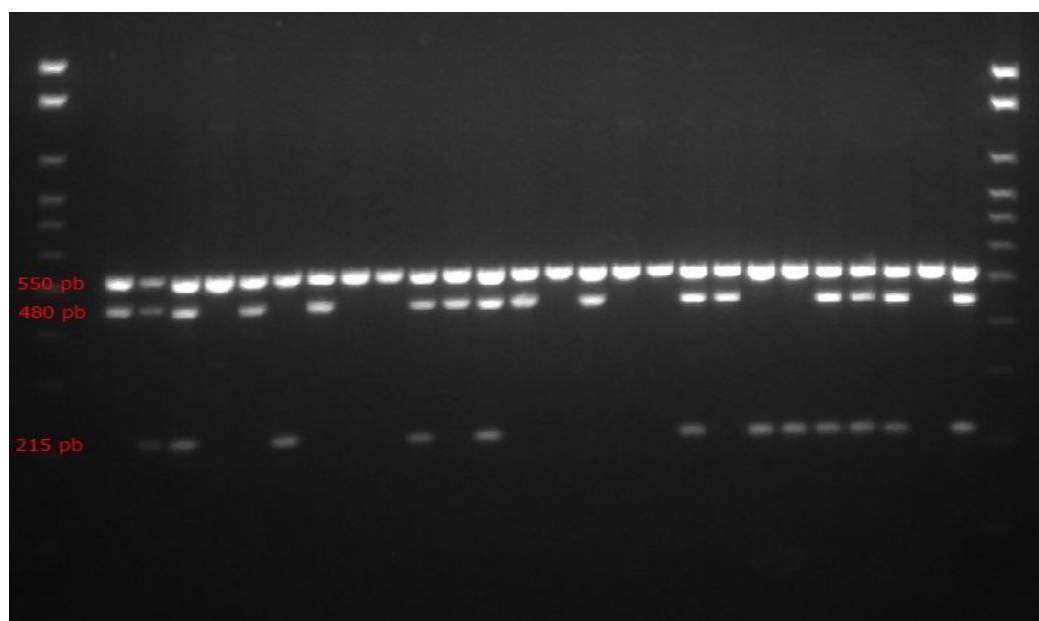
Outro fator bastante relacionado com o desenvolvimento de câncer de mama é a idade da menarca, quanto mais precoce, maior a predisposição assim como o uso de contraceptivos orais. O risco é mais elevado principalmente em mulheres que apresentam menarca precoce (antes dos 11 anos de idade) e menopausa tardia (depois dos 50 anos de idade), nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, fizeram ou fazem uso de contraceptivos orais por longo tempo ou com dosagens elevadas de estrogênio e em mulheres que estão fazendo tratamento de reposição hormonal (PARKIN, *et al.* 2001; COLLINS, *et al.* 2005).

Na população estudada, podemos observar que a média de idade da menarca se deu aos 13,9 anos, sendo que apenas 5 delas iniciaram a menarca antes dos doze anos de idade. Com relação ao uso de contraceptivos orais, da população estudada, 14 (60%) das mulheres diagnosticadas com câncer de mama fizeram uso contínuo de hormônios para contracepção. daquelas que apresentaram diagnóstico precoce, antes dos 41 anos de idade, 60% fizeram uso desse tipo de medicação, podendo ser um fato importante a ser melhor pesquisado. O uso de contraceptivos hormonais está associado a um risco levemente aumentado para Câncer de mama, mas esse risco desaparece após 10 anos da cessação de uso. Mulheres que iniciaram o uso de contraceptivos antes dos 20 anos de idade apresentam um risco ainda maior de desenvolver câncer de mama. (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER 1997).

Como citado por Torresan et al, 2008, em vários lugares do mundo, tem sido realizado estudos epidemiológicos e moleculares como objetivo de compreender melhor

o desenvolvimento do câncer da mama. Os fatores de risco relacionados a hormônios, como a idade da menarca, a menopausa e a primeira gravidez podem influenciar o desenvolvimento desta doença, devido ao tempo de exposição ao estrogênio endógeno. Além disso, fatores como o uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal têm mostrado um aumento da exposição ao estrogênio exógeno (TORRESAN, *et al.* 2008).

A análise molecular dos genes *GSTMI*, *GSTT1* e *GSTP* foi realizado através de PCR seguida de eletroforese, com a devida fotodocumentação, conforme descrita em materiais e métodos e apresentada na Figura 2. Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTT1* e *GSTMI* serão identificados pela ausência dos fragmentos 480 pares de base (pb) e 215 pb, respectivamente. A presença do fragmento de 550 pb corresponde ao controle e revela o sucesso da reação de amplificação (Figura 2).



**Figura 2:** Fotodocumentação da revelação de gel de agarose dos genes *GSTT1* e *GSTMI* através do método Multiplex PCR.

**Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.

Os fragmentos de 215pb e 480pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTMI* e *GSTT1* positivos. A ausência da amplificação de *GSTMI* (215pb) ou *GSTT1* (480pb), indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene, ou para ambos. A presença ou ausência destes genes na população estudada está descrita na Tabela 4.

**Tabela 4:** Frequência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na população estudada.

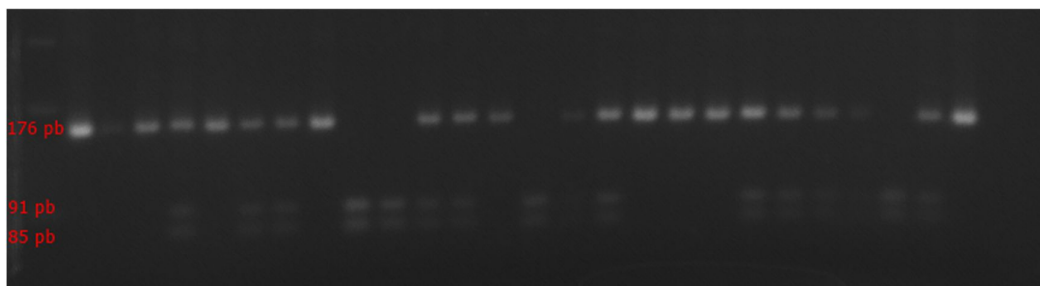
Paciente	<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1/GSTM1</i>
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
5	+			-	
9	+		+		
26	+		+		
32		-		-	-
111	+			-	
117		-	+		
119	+			-	
124		-		-	-
134		-		-	-
144	+		+		
147	+			-	
152	+		+		
158	+			-	
159		-		-	-
161	+			-	
163		-		-	-
167		-		-	-
172	+		+		
174	+			-	
176		-	+		
177		-	+		
178	+		+		
180	+		+		
183	+		+		
186		-		-	-
191	+		+		
<b>Total</b>	<b>16 (61,5%)</b>	<b>10 (38,5%)</b>	<b>12 (46,2%)</b>	<b>14 (53,8%)</b>	<b>7 (27%)</b>
<b>26</b>					

**Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.



Do total de mulheres participantes do estudo, 10 (38,5%) apresentavam a deleção homozigótica para o gene *GSTM1* e 14 (53,8%) para o gene *GSTT1*, sendo que 27% delas, apresentaram nulidade para ambos os genes (Figura 2), conforme descrito na Tabela 4.

A análise do gene *GSTP* pode gerar três produtos de amplificação distintos como resultado, conforme descrito em materiais e métodos e apresentado na Figura 3. O produto constante de 176 pb, é referente ao genótipo homozigoto para o alelo selvagem ou wild-type (*Ile/Ile*), o qual não sofre ação da enzima *BsmI*, originando uma banda não-clivada. Já o aparecimento do produto com uma banda de 91 pb e outra de 85 pb ocorre no caso do genótipo ser homozigoto para o alelo mutante (*Val/Val*) que possui um sítio para a enzima de restrição *BsmI*, que cliva o produto inicial. O produto com três bandas 176, 91 e 85 pb, é gerado caso o genótipo seja mutante heterozigoto (*Ile/Val*) (Figura 3).



**Figura 3:** Fotodocumentação da revelação de gel de agarose dos genes *GSTP* através do método PCR-RFLP. **Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.

Já no caso do gene *GSTP* (Figura 3), os fragmentos de 176 pb, 91 pb e 85 pb foram observados em 46,1% dos indivíduos mutantes heterozigotos *GSTP1 Ile/Val* positivos. A ausência da amplificação das bandas clivadas 91 pb e 85 pb foi observada em 38,5% dos indivíduos *GSTP1 Ile/Ile*. Já 15,4% dos indivíduos se apresentaram como mutantes homozigotos *GSTP1 Val/Val*, não apresentaram fragmentos de 176 pb e apresentaram nas bandas clivadas 91 pb e 85 pb (Tabela 5; Figura 3). Onde pode ser comparado a porcentagem de cada gene para as pacientes controle e para as pacientes em estudo na Tabela 6.

**Tabela 5:** Frequência dos genes *GSTP1* na população estudada.

<b>Paciente</b>	<b><i>GSTP</i></b>		
	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Val/Val</i>
5	+		
9	+		
26	+		
32		+	
111	+		
117		+	
119		+	
124	+		
134			+
144			+
147		+	
152		+	
158	+		
159			+
161	+		
163		+	
167	+		
172	+		
174	+		
176		+	
177		+	
178		+	
180		+	
183			+
186		+	
191	+		
<b>Total</b>			
<b>26</b>	11 (47,8%)	11 (47,8%)	4 (15,4%)

**Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.

**Tabela 6:** Porcentagem dos genes *GSTT*, *GSTM* e *GSTP* nas pacientes controle/estudo

		Controle	Estudo
		n (%)	n (%)
GSTT	Presente	3 (15,8)	16 (84,2)
	Ausente	0 (0,0)	10 (100,0)
GSTM	Presente	1 (7,6)	12 (92,3)
	Ausente	2 (12,5)	14 (87,5)
GSTP	Ile/Ile	2 (15,4)	11 (84,6)
	Ile/Val	1 (8,4)	11 (91,6)
	Val/Val	0 (0,0)	4 (100,0)

. **Fonte:** População incluída no estudo; Maternidade Carmela Dutra, Florianópolis – SC.

As deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* são comuns e resultam em uma perda completa de atividade enzimática, de modo que os indivíduos que os carregam são mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a exposição a carcinogêneos (TORRESAN, *et al.* 2008).

Hayes e Pulford (HAYES, *et al.* 1995) sugeriram que indivíduos com deleções homozigóticas dos GSTs, principalmente do gene *GSTM1*, têm um alto risco de desenvolver alguns tipos de câncer. Chen et al. mostrou em uma meta-análise de 17.254 casos e 21.163 controles que o risco de câncer de mama foi significativamente maior quando associada com a ausência do gene *GSTT1* (CHEN, *et al.* 2011), assim como outros que corroboram com estes achados (ANTON, *et al.* 2010).

Outros estudos genotípicos sugerem que os indivíduos com deleções homozigóticas do gene *GSTM1* tenham um alto risco de desenvolver vários tipos de neoplasia (HELZLSOUER, *et al.* 1998; CHARRIER, *et al.* 1999; PARK, *et al.* 2000; MITRUNEN, *et al.* 2001). Porém, a frequência da eliminação genética de *GSTT1* também varia entre populações distintas, e poucos são os estudos que correlacionaram esse genótipo com um risco aumentado da suscetibilidade de câncer (VAN, *et al.* 2005). No estudo realizado por Park et al. (2000) a associação foi observada em uma amostra de mulheres da população coreana (PARK, *et al.* 2000), enquanto que Mitrunen et al. (2001) a detectou em amostras da população caucasóide da Finlândia (MITRUNEN, *et al.* 2001). Roodi et al. (2004) observaram um efeito protetor quando o gene *GSTM1* está presente (ROODI, *et al.* 2004).

Rossini e pesquisadores (2002), analisaram uma amostra do Rio de Janeiro, descreveram a distribuição genotípica do alelo mutante e encontraram os seguintes genótipos com suas respectivas frequências para o gene *GSTP*: 49,7% para *Ile/Ile*, 38,1% para *Ile/Val* e 12,2% para *Val/Val*. Outro estudo, feito no Rio Grande do Sul, com amostras de descendência europeia, a distribuição genotípica do *Ile105Val* em *GSTP1* foi de 52,2% para *Ile/Ile*, 40,0% para *Ile/Val* e 7,8% para *Val/Val*, valores muito próximas aos obtidos em nosso estudo. E em uma amostra de afro-descendentes residentes na mesma área geográfica, a distribuição genotípica do *GSTP1* foi de 29,0% para *Ile/Ile*, 58,0% para *Ile/Val* e 13,0% para *Val/Val* (Kvitko, *et al.* 2006).

O genótipo *GSTP1*, em combinação com outros polimorfismos *GSTs*, modulam o risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Em mulheres na pré-menopausa, um leve aumento no risco foi observado na combinação *GSTM3\*B* e *GSTP1 Ile/Ile*. No metabolismo do estrogênio, há uma complexa interação entre as isoenzimas do Citocromo P450, catecolamina O-metiltransferase (COMT-L) e isoenzimas *GSTs* (BOLT, 1981). Stucker, *et al.* em 2012 reportaram outra interação funcional entre os genes *GSTM1* e *GSTP1* em um estudo francês, os indivíduos deficientes para *GSTM1* e *GSTP1* se mostraram, em conjunto, importantes modificadores para o risco de desenvolver câncer de pulmão (STUCKER *et al.*, 2002).

A Sociedade Americana de Oncologia Clínica concluiu que pesquisas são necessária para decifrar os muitos problemas não resolvidos relacionados com a má absorção de agentes de quimioprevenção do câncer de mama em mulheres que estão em maior risco. Estes incluem a concepção de ferramentas eficazes e abordagens para educar os provedores na opção de quimioprevenção, intervenções eficazes que comunicam às mulheres elegíveis sobre os riscos e benefícios de agentes preventivos específicos, o desenvolvimento de ferramentas com maior precisão em identificar as mulheres em maior risco, e uma maior compreensão do que as disparidades e a existência de barreiras no que diz respeito ao uso de quimioprevenção entre as mulheres em maior risco de câncer de mama (VISVANATHAN, *et al.* 2013).

## 6 – CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a deleção homozigótica de ambos os genes, *GSTT1* (38,5%) e *GSTM1* (53,8%), e a mutação heterozigótica do gene *GSTP1* *Ile/Val* (47,8%) podem estar associadas com uma maior susceptibilidade ao câncer de mama na população estudada, entretanto se faz necessária a realização de outros estudos, incluindo um número maior de pacientes para confirmar esses achados;

Em relação às características antropométricas 77% das pacientes estavam acima do peso e 60% fez uso de hormônios para contracepção;

Os resultados apresentados neste estudo, assim como os dados relatados em outros trabalhos, deixam claro que a diversidade do genoma humano é um fator muito importante a ser analisado, quando se trata de susceptibilidade ao câncer de mama

## 7 - REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Breast cancer facts & figures 2007- 2008**. Atlanta: American Cancer Society Inc, 2007. 32p.

ANTHONY HOWELL, ANNIE ANDERSON, ROBERT.B CLARKE, STEPHEN W DUFFY, D GARETH EVANS, MONTSERAT GARCIA-CLOSAS, ANDY J GESCHER, TIMOTHY J KEY, JOHN M SAXTON, E MICHELLE N HARVIE. Determinação de risco e prevenção do câncer de mama 28 setembro 2014 **Breast cancer research**. 2014; 16 (5): 446.

ANTON EM, RENNER JD, VALIM AR, DOTTO ML, POSSUELO LG. Avaliação epidemiológica da Influência de dos genes GSTM1 e GSTT1 na susceptibilidade ao câncer de Mulheres mama atendidas em um hospital do sul do Brasil: um Estudo piloto. **Rev AMRIGS**. 54 (4): 411-5, 2010.

BALASUBRAMANIAN SP, COX A, BROWN NJ, REED MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol** 2004;30(6):593-601.

BAN, K. A, GODELLAS, C. V. Epidemiology of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 23, p. 409-422, 2014.

BOLT, B. A breast feeding circle. **Health Visit**, 54(6):245, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

CATSBURG, C.; KIRSH, V. A.; SOSKOLNE, C. L.; KREIGER, N.; BRUCE, E.; HO, T.; LEATHERDALE, S. T.; ROHAN, T. E. Associations between anthropometric characteristics, physical activity, and breast cancer risk in a Canadian cohort. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 145, p. 545-552, 2014.

CARDOSO-FILHO CC. Influência dos polimorfismos dos alelos Mu 1 (GSTM1) e Theta 1 (GSTT1) do sistema da glutathione S-transferase na susceptibilidade ao câncer de mama esporádico. **Dissertação de Mestrado** (2007). Campinas, UNICAMP.

CHARRIER J, MAUGARD CM, LE MEVEL B, BIGNON YJ. Allelotype influence at Glutathione STransferase M1 locus on breast cancer susceptibility. **Br J Cancer** 1999; 79(2): 346-353.

CHEN XX, ZHAO RP, QIU LX, YUAN H, MAO C, HU XC, et al. Glutathione polimorfismo T1 S-transferase é associado com susceptibilidade para cancro da mama. **Citocinas**. 2011; 56 (2): 477-80.

CHOU, Y.C.; WU, M.H.; YU, J.C.; LEE, M.S.; YANG, T.; SHIH, H.L.; WU, T.Y.; SUN, C.A. Genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma folate levels and breast cancer susceptibility: a case-control study in Taiwan. **Carcinogenesis**, v.27, p.2295-2300, 2006.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER: Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data

on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet*, 347:1713-1727, 1997

COLLINS, J. A.; BLAKE, J. M.; CROSIGNANI, P. G. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. **Human Reprod. Update**, 11 (6): 545-560, 2005.

DI PIETRO, MAGNO LAV, RIOS-SANTOS F. Glutathione S-transferases: Overview in cancer research. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. 2010; 6:153-170.

DI PIETRO G, CARDOSO DS, SILVA HMBS, SANTOS JC, SANTOS JR, SIMÕES RA. Profile Development of Noncommunicable Chronic Diseases in a Brazilian Rural Town. **Journal of the American College of Nutrition** 2015; 34:3, 191-198.

ERNESTINA SILVA DE AGUIAR, JULIANA GIACOMAZZI, AISHAMERIANE VENES SCHMIDT, HUGO BOCK, MARIA LUIZA SARAIVA-PEREIRA, LAVÍNIA SCHULER-FACCINI, DAKIR DUARTE FILHO, POLLYANNA ALMEIDA COSTA DOS SANTOS, ROBERTO GIUGLIANI, MAIRA CALEFFI, SUZI ALVES CAMEY, PATRÍCIA ASHTON-PROLLA. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening. **Rev Bras Epidemiol** 2012; 15(2): 246-55

COLDITZ GA, BÖHLKE K. Prioridades para a prevenção primária do câncer de mama. **CA Cancer J Clin**.2014; 64:186-194

FRANEKOVA, M.; ZUBOR, P.; STANCLOVA, A.; DUSSA, C.A.; BOHUSOVA, T.; GALO, S.; DOBROTA, D.; KAJO, K.; PEC, M.; RACAY, P. Association of p53 polymorphisms with breast cancer: a case-control study in Slovak population. **Neoplasma**, v.54, p.155-161, 2007.

GONZÁLEZ DM, CABRERA SJ, HURLE AD. Farmacogenética en oncología. **Med Clin**. 2008;131 (5):184-95.

GORRINI, C., HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 931947, 2013.

GLOBOCAN, 2012. **Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 04 out. 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p.125130, 2011.

HAYES JD, PULFORD DJ. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 1995; 30(6): 445-600.

HELZLSOUER KJ, SELMIN O, HUANG H, STRICKLAND PT, HOFFMAN S, ALBERG A J. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphism and development of breast. **J Natl Cancer Inst**. 1998; 90(7) 512-518.

HONMA HN, DE CAPITANI EM, PERROUD MW JR, BARBEIRO AS, TORO IF, COSTA DB, et al. Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1\*B

polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. **Lung Cancer**. 2008;61:152-62.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - **INCA**. O que é o câncer? Disponível em: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322). Acesso em: abril 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -**INCA**. Controle do câncer de mama. Disponível:[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_controle\\_cancer\\_mama/fatores\\_risco,2015](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/fatores_risco,2015).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - **INCA**. TMN – classificação de tumores malignos. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6ª ed. Brasil, 2004, 254p.

INSTITUTO DE PESQUISA DO GENOMA HUMANO NACIONAL. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Câncer de mama, base de dados de mutação, acesso aberto on-line**. Disponível em: <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. – 2. ed. rev. e atual. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2012.

KVITKO K, GASPAR PA, TORRES MR, HUTZ MH. CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. **Genetics and Molecular Biology** 2006; 29, 4, 613-616.

LO, Y.L.; YU, J.C.; CHEN, S.T.; YANG, H.C.; FANN, C.S.; MAU, Y.C.; SHEN, C.Y. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitosis-regulating gene Aurora-A/STK15/BTAK. **Int. J. Cancer**, v.115, p.276-283, 2005.

MAGNO LAV, TALBOT J, TALBOT T, et al. Glutathione S-transferase variants in a Brazilian population. **Pharmacology**. 2009, 83:231-6.

MARCHAND, L.L.; DONLON, T.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E.; WILKENS, L.R. Estrogen metabolism-related genes and breast cancer risk: the multiethnic cohort study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v.14, n.8, p.1998-2003, 2005.

MANNERNVIK, B.; AWASTHI, Y. C.; BOARD, P. G.; HAYES, J. D.; DI ILIO, C.; KETTERER, B.; LISTOWSKY, I.; MORGENSTERN, R.; MURAMATSU, M.; PEARSON, W. R. Nomenclature for human glutathione S-transferases. **Biochem J.**, v. 282, p. 305–306, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, CONTROLE DOS CÂNCERES DO COLO DO ÚTERO E DA MAMA, **Cadernos de atenção básica**, Brasília DF pg 83, 2013.

MITRUNEN K, JOURENKOVA N, KATAJA V, ESKELINEN M, KOSMA, VM, BENHAMOU S. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast câncer. *Canc Epid Biom Prev*. 2001; 10(3): 229-236.

NAROD SA, FORD D, DEVILEE P, BARKARDOTTIR RB, EYFJORD J, LENOIR G, SEROVA O, EASTON D, GOLDGAR D. Genetic heterogeneity of breast-ovarian cancer revisited. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995;57:957–8



NEWS.MED.BR, 2010. IBGE mostra que a população brasileira está mais gorda: obesidade é mais frequente em mulheres brasileiras, sobrepeso é maior entre os homens e o peso das crianças ultrapassa padrão internacional. Disponível em: <<http://www.news.med.br/p/saude/69728/ibge-mostra-que-a-populacao-brasileira-esta-mais-gorda-obesidade-e-mais-frequente-em-mulheres-brasileiras-sobrepeso-e-maior-entre-os-homens-e-o-peso-das-criancas-ultrapassa-padrao-internacional.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

ONAY, V.U.; AALTONEN, K.; BRIOLLAIS, L.; KNIGHT, J.A.; PABALAN, N.; KILPIVAARA, O.; ANDRULIS, I.L.; BLOMQVIST, C.; NEVANLINNA, H.; OZCELIK, H. Combined effect of CCND1 and COMT polymorphisms and increased breast cancer risk **BMC Cancer**, v.8, p.6-16, 2008.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur. J. Cancer**, 37: 4-66, 2001.

PAL T, PERMUTH-WEY J, BETTS JA, KRISCHER JP, FIORICA J, ARANGO H, LAPOLLA J, HOFFMAN M, MARTINO MA, WAKELEY K, WILBANKS G, NICOSIA S, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinomacases. **Cancer** 2005;104:2807–16.

PARK SK, YOO KY, LEE SJ, KIM SU, AHN SH, NOH DY. Alcohol consumption, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Pharm Gen.* 2000; 10(4): 301-309.

PARKIN DM, BOYD L, WALKER LC. A fração de câncer atribuíveis ao estilo de vida e fatores ambientais no Reino Unido em 2010. **Br J Cancer**. 2011; 105: S77-S81

PAVANELLO S, CLONFERO E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutation Research**, 2000. 463: 285-308.

PEMBLE, S.; SCHROEDER, K. R.; SPENCER, S. R.; MEYER, D. J.; HALLIER, E.; BOLT, H. M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J. B. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochem. J.**, v. 300, p. 271-6, 1994.

RANKINEN T, PERUSSE L, GAGNON J, CHAGNON YC, LEON AC, SKINNER JS, et al. Angiotensin-converting enzyme ID polymorphism and fitness phenotype in the HERITAGE Family Study. **J Appl Physiol**. 2000;88:1029-35.

REIS, A. A. S. **Associação do polimorfismo genético em carcinomas da tiróide**. [Tese Doutorado] Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, 2010.

RISCH HA, MCLAUGHLIN JR, COLE DE, ROSEN B, BRADLEY L, FAN I, TANG J, LI S, ZHANG S, SHAW PA, NAROD SA. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. **J Natl Cancer Inst** 2006;98: 1694–706.

ROODI N, DUPONT WD, MOORE JH, PARL FF. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. **Cancer Res**. 2004; 64(4): 1233-1236.

ROSSI, T.; PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; FREITAS, L. F.; HERRERA, A. C. S. A.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Breast cancer and oxidative stress in chemotherapy. **Applied Cancer Research**, v. 29, n. 4, p. 150156, 2009.

ROSSINI A, RAPOZO DCM, AMORIM LMF, et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet. and Mol. Res.** 2002; 1 (3): 233-240.

ROCHA AV, TALBOT T, SILVA TM, et al. Is *GSTM1* null polymorphism a risk factor in Primary Open Angle Glaucoma? **Molecular V**, 2011.

SAXENA, DHILLON VS, RAISH H, ASIM H, S REHMAN, SHUKLA NK, et al. Detecção e relevância dos polimorfismos genéticos da linha germinativa em glutathione S-transferases (GSTs) em pacientes com câncer de mama de população indígena do Norte. **Breast Cancer Res Treat.** 2009; 115 (3): 537-43.

SEONG M-W, CHO SI, KIM KH, CHUNG IY, KANG E, LEE JW, et al. A multi-institutional study of the prevalence of BRCA1 and BRCA2 large genomic rearrangements in familial breast cancer patients. **BMC Cancer.** 2014;14(1):645.

SHU, X.O.; MOORE, D.B.; CAI, Q.; CHENG, J.; WEN, W.; PIERCE, L.; CAI, H.; GAO, Y.T.; ZHENG, W. Association of cyclin D1 genotype with breast cancer risk and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, v.14, p.91-97, 2005.

SILVA TM, MARQUES-FILHO MF, MARQUES CR, et al. **Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk of upper aerodigestive tract câncer among moderate smokers.** *Genet. Mol. Res.* 13 (1): 528-537 (2014).

STUCKER, I.; HIRVONEN, A.; WAZIERS, I.; CABELGUENNE, A.; KATJA MITRUNEN, K.; CÉNÉE, K.; KOUM-BESSON, E.; HÉMON, D.; BEAUNE, P.; LORIOT, M.A. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung câncer susceptibility. **Carcinogenesis**, 23(9):1475-81, 2002.

TORRESAN C, OLIVEIRA MM, TORREZAN GT, DE OLIVEIRA SF, ABUÁZAR CS, LOSI-GUEMBAROVSKI R, et al. Polimorfismos genéticos em estrogênio via metabólica e câncer de mama: uma associação positiva com genótipos CYP / GST combinados. **Clin Exp Med.** 2008; 8 (2): 65-71.

VAURY, C.; LAINE, R.; NOGUIEZ, P.; DE COPPET, P.; JAULIN, C.; PRAZ, F.; POMPON, D.; AMOR-GUÉRET, M. Human glutathione S-transferase CYP1A1\*2A null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription. **Cancer Res.**, 55: 5520-5523, 1995.

VAN DER HEL OL, BUENO-DE-MESQUITA HB, VAN GILS CH, ROEST M, SLOTHOUBER B, GROBBEE DE, PEETERS PHM. Cumulative genetic defects in carcinogen metabolism may increase breast cancer risk (The Netherlands). *Canc Caus Cont.* 2005; 16(6): 675-681.

VOGL F.D., TAIOLI E., MAUGARD C., et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 and Breast cancer: A pooled analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.** 2004. 13 (9):1473-1479.

VISVANATHAN K, P HURLEY, BANTUG E, BROWN P, COL NF, CUZICK J, DAVIDSON NE, DECENSI A, FABIAN C, FORD L, J GARBER, KATAPODI M, B KRAMER, MORROW M, B PARKER, RUNOWICZ C, VOGEL VG, 3, WADE JL, LIPPMAN SM. Uso de intervenções farmacológicas para a redução do risco de câncer de mama: Sociedade Americana de diretriz de prática clínica. **Clinical Oncology. J Clin Oncol.** 2013; 31. 2942-2962.

WCRF/AICR WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: **American Institute for Cancer Research**, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Breast cancer: prevention and control.** Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>>. Acesso em: 11 de abril de 2016.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer NCI NATIONAL CANCER INSTITUTE / U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. What you need to know about breast cancer. **National Institutes of Health**, publication n. 121556, 2012.

ZHENG T, HOLFORD TR, ZAHM SH, OWENS PH, BOYLE P, ZHANG Y. Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, alcohol consumption and breast cancer risk. **Br J Cancer** 2003; 88(1): 58-62. 12.

ZIMINIAK, P., NANDURI, B., PIKULA,S, BANDOROWICZ-PIKULA, J., et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *European Journal of Bioch.* 1994. 224: 893- 899.